动 物 学 研 究 2009，Apr. 30(2): 121−130 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.02121

草鱼种群 SSR 分析中样本量及标记数量对遗传多度的影响

李 鸥[1,2]，赵莹莹[1,3]，郭 娜[2]，鲁翠云[1]，孙效文[1,*]

（1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所，黑龙江 哈尔滨 150070；2. 大连水产学院 生命科学与技术学院，辽宁 大连 116023；3. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海 201303）

摘要：利用 45 对微卫星分子标记（SSR），以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)自然群体为实验材料，探讨野生群体遗传多样性研究中所需的最适样本量与标记量。实验设置 6 个样本量梯度，9 个标记量梯度。对等位基因数（N_a）、有效等位基因数（N_e）、观察杂合度（H_o）、期望杂合度（H_e）等遗传多样性指标的变化趋势进行统计分析。结果表明，样本量、微卫星标记的数量和多态性水平对群体遗传多样性均有较大的影响，其中等位基因数与样本量大小呈显著正相关，而杂合度随标记量的增多而剧烈波动。当取样量大于 40，标记量大于 25 时，各遗传参数值趋于稳定。因此，在应用微卫星标记对水产动物自然群体的遗传学研究中，要根据所研究种类的特点，尽可能采样 40 尾以上，采用 25 个以上标记，避免由人为选择的偏差对群体遗传多样性水平的正确评估所造成的影响。同时根据上述研究结果，对陕西草鱼自然群体进行了遗传多样性的评估，结果显示该群体平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均观测杂合度、平均期望杂合度分别为 7.26、4.21、0.73、0.68，认为该群体具有较高的遗传多样性。

关键词：样本容量；标记量；草鱼；自然群体；遗传多样性；微卫星分子标记
中图分类号：Q959.468; Q347; Q958.12 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)02-0121-10

Effects of Sample Size and Loci Number on Genetic Diversity in Wild Population of Grass Carp Revealed by SSR

LI Ou[1,2]，ZHAO Ying-ying[1,3]，GUO Na[2]，LU Cui-yun[1]，SUN Xiao-wen[1,*]

(1. *Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin* 150070, *China;*
2. *College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian* 116023, *China;*
3. *College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai* 200090, *China*)

Abstract: Sample collection and marker selection are of primary importance in population genetic studies, and can greatly influence the analysis and interpretation of the data obtained. Microsatellite DNA sequences are the most revealing DNA markers available so far for inferring population structure and have been widely employed in genetic studies of populations. Nevertheless，few studies have specifically examined the effects of sample size and loci number on various genetic diversity measures in population genetic work using these markers. Here，we examined this issue using experimental data from an analysis of genetic diversity of wild populations of grass carp at 45 polymorphic microsatellite loci. The following genetic diversity measures were studied: number of alleles per locus (N_a), effective number of allele per loci (N_e)，observed hererozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). We also tried to infer the theoretical minimum sample size and loci number needed for population genetic studies with microsatellite loci. The results are as follows: (1) N_a and Mean number of allele over loci (*MNA)* are significantly affected by sample size. It increase according to the raise of the sample size, only when the sample size exceeds 40 it tends to be stable. The significant correlation between sample size and N_a was observed and the correlation curve is Y=3.8403+0.6376, r^2=0.967. However, there is no significant correlation between the mean value of N_e, H_o, H_e and the sample size. Mean value of H_o, H_e fluctuate with the raise of the sample size, only when the sample size exceeds 40 it manifest a stable trend. (2) Evaluating of different genetic parameters with the makers of different polymorphism information content, a significantly different result were acquired. When *PIC*>0.5, N_a, N_e, H_o, H_e were 3.6, 1.5934, 0.2824, 0.3540, While *PIC*<0.5, N_a, N_e, H_o, H_e were 9.5, 5.9209, 0.8497, 0.8242 respectively. Accordingly, marker selecting strategy has much greater impact on evaluation of genetic diversity. (3) According to the rise of loci number, the value of genetic parameter could be divided into three

收稿日期：2008-10-29；接受日期：2009-03-13
基金项目：国家科技基础条件平台项目（2006DKA30470_005）；国家重大基础研究计划（2004CB117405）
*通讯作者（Corresponding author），Tel：045184604803，E-mail：sunxw2002@163.com

stages: ① Descending stage: loci number between 0−5, values of N_a, N_e, H_o, H_e indicated descending trend. ② Loci number between 5−10, values of N_a, N_e, H_o, H_e demonstrate ascending trend. ③ When loci number exceeded 15 values of N_a, N_e, H_e tend to be stable, while only when loci number exceeded 25 the value of H_o tend to be stable. Analysis above proved that not only the sample size and loci number but also the polymorphism information of microsatellite markers have significant effect on the estimation of population genetic diversity. So, we suggested that when microsatellite markers were used to estimate genetic diversity of population the minimum loci number and sample size are needed to exceed 25 and 40, respectively. Moreover, the conclusion above has been used to evaluate the genetic diversity of wild population of grass carp, values of the parameter were N_a=7.26、N_e =4.21、H_o=0.73、H_e=0.68, which demonstrated that has a relatively high diversity, a totally different conclusion from the former studies. Therefore, further researches are necessary for the evaluation of genetic diversity of geographically different population of grass carp.

Key words: Sample size; Loci number; Grass carp; Wild population; Genetic diversity; Microsatellite DNA marker

遗传多样性是一个物种或种群适应环境与进化的基础，是评价种质资源的依据。从遗传多样性和遗传结构的角度探讨自然群体遗传资源的现状是现阶段水产动物种质资源保护和利用的重点。生态环境的污染、生存条件的恶化，已使草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)天然的种质资源遭到破坏（Zhang et al, 1999）。对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)自然群体遗传多样性的评估和保护日趋受到越来越多的研究工作者关注。国内一些学者报道了应用同工酶(Wu et al, 1992; Zhao et al, 1996)、RAPD (Zhang et al, 2001)、mtDNA (Li et al, 1998b; Zhang et al, 2002)、SSR (Liao et al, 2005)和 RFLP (Wu et al, 2006)等标记对长江等诸多水系的草鱼种群遗传结构和遗传多样性的研究，但由于检测手段的不同以及样本量的差异，所获得的结果不尽相同，甚至得到相反的结论。在对自然群体进行遗传学评价时，样本的采集、标记的选用是正确评估群体遗传结构的先决条件，它关系到研究结果的可靠性(Zhou et al, 2005)，样本数和等位基因位点数过少可能导致检测到的变异偏低，甚至检测不到变异(Sjögren et al, 1994)。

在群体遗传学研究中，合理的取样策略不仅要使样本具有代表性，而且要包含尽可能多的遗传变异。在分子生态学研究中，样本量理论抽样数的多少除了依赖于空间分布图式、置信水平和允许误差以及种群的密度，还受到研究所用的遗传标记类型(Zhou et al, 2005; Liu et al, 2005)及其多态性水平的影响。一般认为，遗传标记在自然种群中的等位基因数量越多，所研究位点的多态性越高，实际检测中所需的采样数目就越大。微卫星标记（SSR），由于具有多态性高、共显性遗传、易于检测、重复性高等优点，广泛应用于种群结构估测以及种群演化的历史分析(Tang et al, 2008; Dreisigackera et al, 2005; Huang et al, 2004; Zhang et al, 2001)，但由于其在水产动物方面的开发及利用的滞后性，使得微卫星标记的选用受到限制，样本采集也经常是依据宏观生态学理论和个人的经验而确定的。Lu et al(2008)对镜鲤养殖群体遗传结构分析的最适样本容量进行了评估。本文采用 45 个微卫星分子标记对草鱼自然群体的遗传多样性进行评估，检测样本量、标记量对微卫星各位点等位基因数、杂合度等遗传多样性度量指标的影响，以期能为草鱼种质评估中样本采集量和标记使用数量提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采集 60 尾黄河陕西河段草鱼（设置 6 个梯度：10、20、30、40、50、60 尾），45 个微卫星分子标记（设置 9 个梯度：5、10、15、20、25、30、35、40、45 个标记）（表 1），检测不同样本容量、标记量对群体遗传多样性的测度。引物由上海生物工程公司合成。

1.2 微卫星 DNA 多态性检测

常规酚−氯仿法提取草鱼的基因组 DNA(Wei et al, 2001)，8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测基因型，通过 Gelpro (verion4.5) 软件完成微卫星 DNA 数据的读取和校正。

1.3 统计分析

用PopGene (verion 3.2)软件统计草鱼自然群体 45 个微卫星基因座的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度（H_o）、期望杂合度（H_e）和多态信息含量（*PIC*），并分别计算不同样本容量及不同标记量下各遗传参数的平均值。SPSS11.5 软件对各区组的遗传多样性参数进行方差分析（one-way ANOVA）、相关性分析(correlation analysis)、曲线拟合（curve estimation），计算Pearson

表 1　草鱼的微卫星标记及引物信息

Tab. 1　Microsatellite makers and their primers information for the grass carp

座位 Locus	核心序列 Core motif	引物序列 Primer sequence (5′–3′)	片段大小 Size(bp)	退火温度 Ta (°C)	GenBank 登陆号 GenBank Accession No	*PIC*
HLJC53	GT9	F:AATGAGCAGAGGAGGAACCA R:CCATGCCTCGTGTGTATGAG	228−264	60	FJ213551	0.24
HLJC57	CT31/GT26	F:GACCTGGCCTGTGTTCATCT R:TCGACGATCTCTGCATCATC	180−233	60	FJ213552	0.79
HLJC64	GA20	F:CGACGATCCTTAAGCAGAGG R:ATTGGTGTCGAAAGGTACGG	245−291	60	FJ213553	0.71
HLJC66	GA57	F:GATTGAAAGCCCCACATGAT R:CACGTTCATTCGGTCCTGTA	128−217	60	FJ213554	0.88
HLJC67	GA26	F:TGTTAGCGGAAGCTGAGACA R:GTCCTCACCCACTGCATTTT	156−197	60	FJ213555	0.83
HLJC69	CA8/GA27	F:GCAGCAGCTGTTTTGGTCTT R:CAACCTACAGTTGCCTTTCG	224−248	60	FJ213556	0.71
HLJC72	GT41/GA8	F:AGAGAGCAGCCGTTGACACT R:TACTCCCCAGCTGTTTCCTG	110−216	60	FJ213557	0.91
HLJC74	GA22	F:GTTGTCTCAGAGCCAGCATT R:TGCAATCTGCTTTTGCTTACA	215−257	60	FJ213558	0.67
HLJC79	CT18	F:ACACCTTCCCAGACAGATGG R:TCCACTCATCGCTGACTCAC	241−284	60	FJ213559	0.62
HLJC81	GA31	F:CCAGCTTCTGCCTTACCATC R:TGCATTTTCGTTGGACACAT	166−224	60	FJ213560	0.72
HLJC85	CT18	F:TCTGAGCGCTGTGAAGACAC R:GTCGACGATCCCTCTCAGTC	188−227	60	FJ213561	0.82
HLJC87	GT24	F:GAAACTGAGACCGTTGCACA R:TCGACGATCAAAGCAATCTCT	235−275	60	FJ213562	0.79
HLJC88	GA32	F:TCCAGATGCAGCTCACTTGT R:ACCCCGTTGGAGTTTTTCTC	239−310	60	FJ213563	0.79
HLJC91	GA22	F:TGGAGAAAAGGGCTGTAGGA R:ACTCCCCTCCCTTCCTCATA	141−186	60	FJ213564	0.80
HLJC104	CT18	F:GACCCACCACTTACATCCAAA R:GGCTACAGAAGGGAATGTGG	157−202	60	FJ213565	0.83
HLJC107	CT21	F:GCAAGCTGCATTCACTCTGA R:TGGAGAAAAGGGCTGTAGGA	164−203	60	FJ213566	0.77
HLJC111	GA46	F:GCAAAGCAAAACACAGCAAA R:CGACGATCTGTCCATCAGTG	176−228	60	FJ213567	0.91
HLJC113	CT15	F:AGACATCAGCGCTTGGAGAT R:GTGTCATGAAATCGGCAGGT	219−240	60	FJ213568	0.74
HLJC115	GA16	F:AAATGCCGTCCAGTGAGTCT R:TCAGCCTGCACATAACAAAGA	273−372	60	FJ213569	0.80
HLJC116	CT27	F:TGGTTGGACAGCAAACAAAG R:TGAAGGTCTGGCTGATGATG	265−317	60	FJ213570	0.80
HLJC117	GA21	F:CATTCCGTCAATGACCACAG R:CACGCAAAGCTGATTCATGT	160−187	60	FJ213571	0.69
HLJC118	GA50	F:ACAGCACATTCAGGGAGGAC R:AGCAAAGCAGCAAACCTCTC	106−234	60	FJ213572	0.89
HLJC119	CAGA9	F:AGACAAATGGACGGACGAAC R:TGACACTGAAGACTGGACTGG	100−144	60	FJ213573	0.71
HLJC121	GA21	F:GGAGGAGGAGGAGAAGCAGT R:TCCTTCGGAGAGAGACCGTA	438−489	60	FJ213574	0.79
HLJC126	CT20	F:TTCTCTGCCCTGTTGTGTTG R:AAATTGAGGCCCTGAGGACT	184−204	60	FJ213575	0.72
HLJC127	CT29	F:TCGACTGACGCAGGATTATG R:TGTGCAAACAGAGGAGAAGAAA	188−298	60	FJ213576	0.78

引物通过草鱼微卫星 DNA 文库的构建、磁珠富集筛选获得。

The primers were developed from a $(GA)_n$ enrichment DNA library created from the grass carp genome.

相关系数，并做相关系数的 F 显著性检验（显著性水平 a=0.05）。

2　结　果

2.1　样本量对遗传多样性测度指标的影响

2.1.1　观测等位基因数与样本容量　通过对草鱼不同样本容量的区组进行遗传多样性分析，结果显示，样本大小与所观测到等位基因的数、各位点的平均等位基因数(mean number of allele/locus, *MNA*)均呈显著正相关(表 2，图 1)。样本量越大，估测出的平均等位基因数也越大；反之，种群的样本量越小，估测出的平均等位基因数也越小(图 1)。*MNA* 随样本容量的增大而增加，且可分为两个阶段：当样本容量小于 40 时，*MNA* 随样本容量的增大而显著增多；当样本容量大于 40 时，*MNA* 随样本容量的增大而增多的速率变小并逐渐趋于稳定，而且，样本量受等位基因数的检测影响显著，即位点的多态性越高，样本量对 *MNA* 的影响就越大。

2.1.2　有效等位基因数与样本容量　平均有效等位基因数对样本容量的影响不显著（图 1）。而各不同的位点有效等位基因数受样本容量的影响不同，呈现 3 种变化规律：①有效等位基因数的变化随样本容量的增大而增多的趋势不显著，如标记 HLJC2 仅有 1—2 个主效基因，在等位基因分布中占有 0.5 以上的基因频率，占所用标记的 8.8%；②有效等位基因数的变化随样本容量的增大有先增高后降低，最终趋于稳定，与平均有效等位基因数的变化趋势相同（图 1），如位点 HLJC69、HLJC33，趋势变化主要发生在样本量为 10—30 阶段，在样本量达到 40 以上趋于稳定，此类标记占所用标记的 86.7%；③有效等位基因数的变化随样本容量的增大而增多的趋势显著，位点 HLJC72 有效等位基因数较大（14 个等位基因），等位基因分布频率较均匀，随着样本容量的增大，低频等位基因被检出，有效等位基因数随样本量的增大而增多，当样本容量为 60，位点 HLJC72 的有效等位基因占等位基因的 60.7%，其中低频等位基因近 40%。此类位点仅占所用标记的 4.5%。

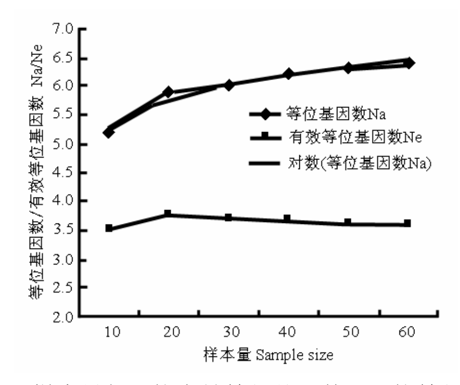


图 1　样本量与平均有效等位基因数，平均等位基因数间的相关关系及拟合曲线：Y=3.8403+0.6376 ln$X$，r^2=0.967

Fig. 1　Correlations between sample size and average number of observed alleles, effective alleles Curve Estimation: Y=3.8403+0.6376 ln$X$，r^2=0.967

2.1.3　杂合度与样本容量　对草鱼自然种群的 45 个多态性微卫星位点期望杂合度及观测杂合度的估测发现：不同区组间的期望杂合度与观测杂合度基本不受到样本量大小的影响(表 2，图 2)。杂合度的变化并不随取样量增大或缩小而表现出显著的变化趋势，只有当样本量达到 40 以上时期望杂合度与观测杂合度均表现出较高的稳定性。

2.2　标记的选用对遗传多样性测度指标的影响

2.2.1　PIC 不同的标记对遗传多样性测度　一般认为，在某一群体中，当 PIC>0.5 时该位点表现为高度多态；当 0.25<PIC<0.5 时该位点表现为中度多态；当 PIC<0.25 时该位点表现为低度多态(Dong et al, 2007; Liu et al, 2008)。在本研究中的 45 个多态性微卫星位点中，34 个位点具有高度多态性，9 个位点具有中度多态性，2 个位点具有低度多态性。

表 2　平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均观测杂合度和平均期望杂合度随样本量的变化

Tab. 2　The change of average number of observed alleles, effective number of alleles, mean values of observed heterozygosity and expected heterozygosity according to different sample size

样本量 Sample size	平均等位基因数N_a	标准偏差 *SD*	平均有效等位基因数N_e	标准差 *SD*	平均观测杂合度H_o	标准偏差 *SD*	平均期望杂合度H_e	标准偏差 *SD*
10	5.2222	2.1094	3.5273	1.673	0.6265	0.2794	0.6725	0.1987
20	5.8889	2.3858	3.7772	1.8211	0.6367	0.2735	0.6814	0.183
30	6	2.4309	3.6855	1.8138	0.6288	0.2815	0.6659	0.1842
40	6.2222	2.5574	3.683	1.8867	0.6149	0.2712	0.6596	0.187
50	6.3111	2.6953	3.6132	1.9366	0.6077	0.2755	0.6471	0.193
60	6.4	2.7502	3.6118	1.9292	0.6029	0.276	0.6448	0.1965

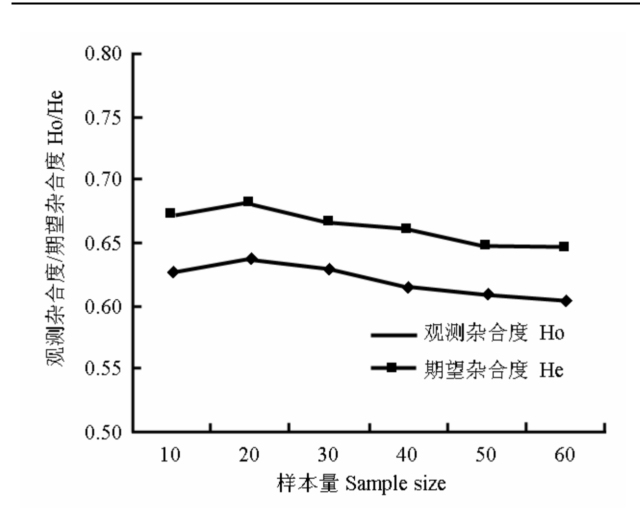


图 2　样本量与平均观测杂合度、平均期望杂合度间的相关关系

Fig. 2　Correlations between sample size and mean values of H_e, H_o

将这 45 个多态性微卫星分子标记分成两组，中、低度多态信息含量位点(*PIC*<0.5)和高度多态信息含量位点（*PIC*>0.5）。通过对两组平均等位基因数（*MNA*），平均有效等位基因数，平均期望杂合度，平均观测杂合度等遗传参数的比较（表 3），结果发现：选用不同多态信息含量的分子标记对群体遗传多样性的评估结果存在极显著差异（F=89.07，P=0.000）。

2.2.2　不同标记数量对遗传多样性的测度　将 45 个多态性微卫星标记随机设置 9 个梯度，依次为 5、10、15、20、25、30、35、40、45 个标记，构成 9 个区组，对样本数量为 60 的草鱼自然群体进行遗传参数的评估，随着所选用标记数量的增加，平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均期望杂合度、平均观测杂合度等遗传参数的变化也可大致划分为 3 个阶段（表 4; 图 3，4）：①下降阶段：当位点数从 0—5 时，平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均期望杂合度、平均观测杂合度等遗传参数呈现下降趋势；②上升阶段：当位点数从 5—10 时，这些参数的值呈现上升趋势；③平稳阶段：当位点数超过 15 时，平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均期望杂合度，均趋于稳定，然而平均观测杂合度只有当标记量达到 25 时才呈现稳定趋式。

2.2.3　最低样本量以及标记量的估测　我们对 6 个样本量，与 9 个标记量梯度所构成的 54 个区组，

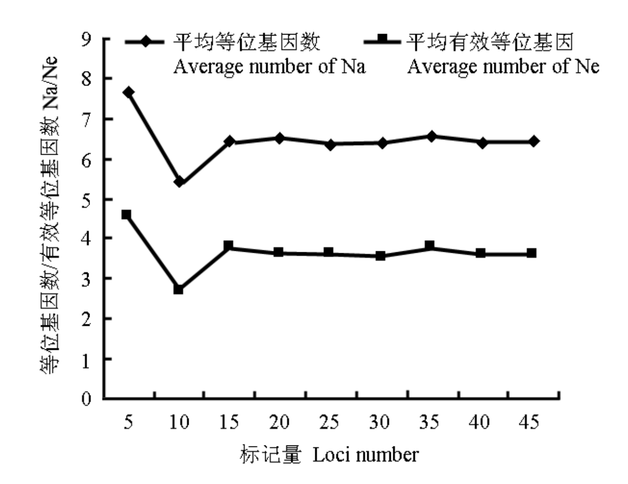


图 3　标记量与各位点平均等位基因数，平均有效等位基因数之间的相关关系

Fig. 3　Correlations between average number of N_a, N_e and loci number

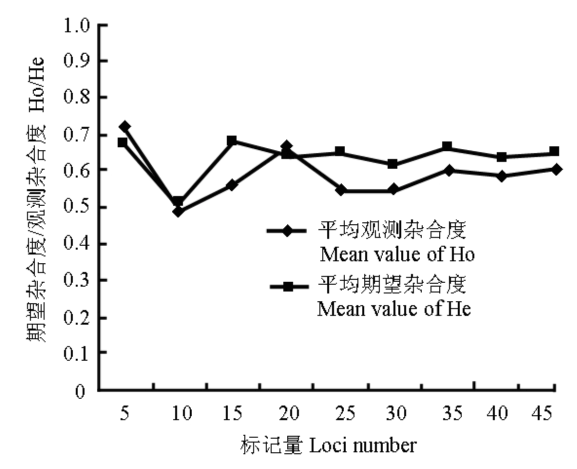


图 4　标记量与各位点平均观测杂合度、平均期望杂合度之间的相关关系

Fig. 4　Correlations between mean values of H_o, H_e and loci number

表 3　多态信息含量不同的标记对遗传多样性参数的测度

Tab. 3　Evaluate of different genetic parameters with the makers of different polymorphism information content（*PIC*）

	多态信息含量小于 0.5　*PIC*<0.5				多态信息含量大于 0.5 *PIC*>0.5			
	N_a	N_e	H_o	H_e	N_a	N_e	H_o	H_e
平均值 Average	3.6	1.5934	0.2824	0.3540	9.5	5.9209	0.8497	0.8242
标准差 Standard diviation	1.2649	0.3044	0.1563	0.1284	1.5092	1.8223	0.1056	0.0553

表 4 平均等位基因数、平均有效等位基因数、平均观测杂合度、平均期望杂合度随标记量的变化

Tab. 4 The change of average observed number of alleles, effective number of alleles, observed Heterozygosity and expected heterozygosity accordance to the variation of the loci number variety

标记量 Number of loci	平均等位基因数N_a	标准偏差 *SD*	平均有效等位基因数N_e	标准偏差 *SD*	平均观测杂合度H_o	标准偏差 *SD*	平均期望杂合度H_e	标准偏差 *SD*
5	7.6	3.3615	4.5429	2.1306	0.7225	0.3587	0.6706	0.3298
10	5.4	2.8363	2.6752	1.5692	0.4875	0.2999	0.5089	0.2425
15	6.4	2.7203	3.7867	2.1096	0.561	0.2585	0.6777	0.1505
20	6.5	2.6458	3.6417	1.6817	0.6692	0.2837	0.6435	0.229
25	6.32	2.8827	3.5879	2.1409	0.5499	0.2634	0.6459	0.1712
30	6.3667	2.9767	3.4966	2.0461	0.5475	0.2923	0.6129	0.2256
35	6.5429	2.8732	3.7613	1.9863	0.603	0.2734	0.6626	0.1868
40	6.375	2.7891	3.5824	2.0337	0.5846	0.2828	0.6331	0.2049
45	6.4	2.7502	3.6118	1.9292	0.6029	0.276	0.6448	0.1965

分别计算它们的平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均期望杂合度、平均观测杂合度等遗传参数。结果表明：当样本量为 60，位点数达到 25 个以上，或当标记量为 45，样本量大于 40 有效等位基因数趋于稳定（图 6）。当样本量为 60 个时，位点数达到 20 个以上，或当标记量为 45，样本量大于 20 观测杂合度趋于稳定（图 7）。当样本量为 60 个时，位点数达到 15，或当标记量为 45，样本量大于 30 期望杂合度趋于稳定（图 8）。然而等位基因数却随着样本量的增大而增加，没有出现平台现象，只有当样本量大于 40 时，等位基因数的增加速率随样本容量的增大而有所下降（图 5）。

2.3 陕西草鱼自然群体遗传多样性

根据上述研究结果，对陕西草鱼自然群体进行群体遗传多样性的评估，结果显示该群体平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数、平均观测杂合度、平均期望杂合度分别为 7.26、4.21、0.73、0.68。

3 讨 论

3.1 样本量对遗传多样性的影响

在群体遗传多样性研究中，样本容量的确定首先应考虑到研究中所采用的标记种类。Li et al(1998a)在应用同工酶技术进行淡水鱼类种质研究中认为样本容量应大于 30。Sjögren & Wyöni(1994)在使用同工酶研究有限种群时发现，当样本量达到 30，有 95%优势等位基因被检出。1993 年，联合国粮农组织（FAO）推荐以微卫星分子标记技术作为 14 种家畜遗传多样性分析的首选标记（Barker et al, 1993）。与同工酶相比，微卫星 DNA 标记具有较

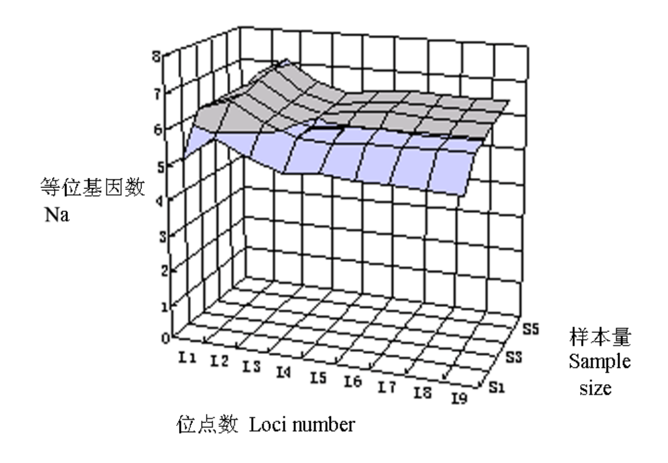


图 5 平均等位基因数与样本量和位点数的相关关系

Fig. 5 Correlation between average number of *N*a and the sample size, loci number

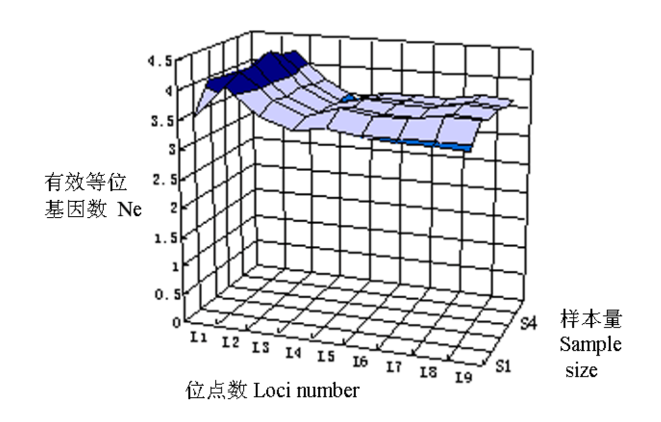


图 6 平均有效等位基因数与样本量和位点数的相关关系

Fig. 6 Correlation between average number of N_e and the sample size, loci number

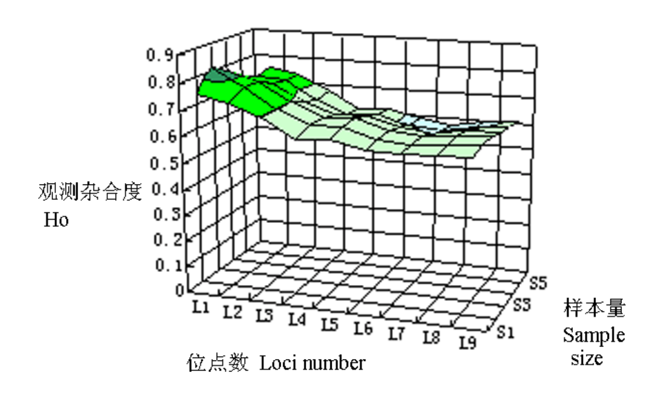


图 7　平均观测杂合度与样本量和位点数的相关关系
Fig. 7　Correlation between mean values of H_o and the sample size, loci number

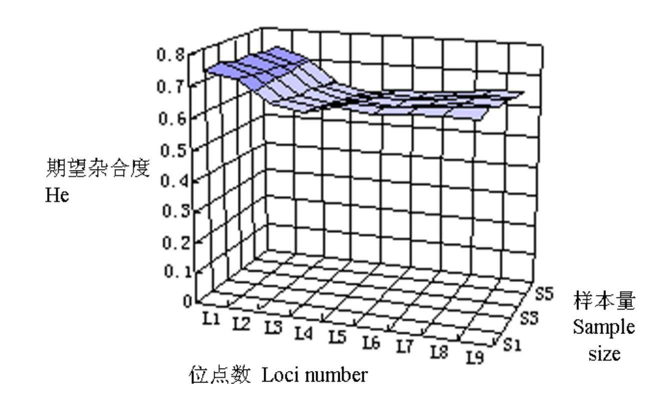


图 8　平均期望杂合度与样本量和位点数的相关关系
Fig. 8　Correlation between mean values of H_e and the sample size, loci number

高的多态性，一般每个位点有高达 20—30 个等位基因，采样量 30—50 较为适宜（Yan et al, 2004）。

种群的遗传多样性可通过多种遗传参数来衡量，如杂合度、多态位点的比例、各位点的平均等位基因数等(Richards et al, 1996; Nei et al, 1987)。然而，应用不同的遗传参数进行遗传多样性评估时所需样本容量不同。在微卫星数据的分析中常用两类多样性指标：一是等位基因数(N_a)，各位点的平均等位基因数(*MNA*) 或有效等位基因数(N_e)；二是基于等位基因频率分布的杂合度的分析(Nei et al, 1987; Leberg et al, 2002)，包括观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)。Zhu et al (2006)在大豆居群采样策略的研究中发现，当以期望杂合度、Shannon多样性指数等来衡量，在样本量达到 27 时，已基本达到该居群总体遗传多样性水平的 95%。而以等位基因数目来衡量时，当样本量达到 52 时，遗传多样性水平接近居群总体水平的 95%(Zhu et al, 2006)。

本研究结果表明，等位基因数随着样本容量的增大而增加，样本量 60 时等位基因数达到最大值，即只有当种群的样本采集量足够大时，所估计出的 *MNA* 才能反映出种群的真实 *MNA* 值，否则可能会影响到对种群 *MNA* 的估测。稀有等位基因在微卫星标记中大量存在 (Yan et al, 2004)，并随着样本容量的增大不断的被检出，检测的样本量越大，其稀有等位基因被检出的概率就越大。而有效等位基因数作为反映群体遗传变异大小的一个指标，其数值越接近所检测到的等位基因的绝对数，表明等位基因在群体中分布越均匀。样本容量的增大对有效等位基因数变化趋势的影响与等位基因数相比不同，对于有效等位基因数而言，随着样本量的增加虽然稀有等位基因仍然增加，但这些稀有等位基因频率过低，对有效等位基因数增减的贡献微乎其微。在本研究中，平均有效等位基因数随样本量的增加而增加，当样本量达到 40 以上时有效等位基因的数量才趋于稳定。

观测杂合度，期望杂合度均来源于等位基因分布频率的变动结果，Nei et al (1974)通过对墨西哥脂鲤两个群体蛋白位点的期望杂合度比较研究认为，采用较多的位点数比采用较大的样本容量更能得到可靠的结果。利用 67 个位点(至少是 30 个位点)，20 的样本容量计算得到的期望杂合度比采用 17 个位点，79 样本容量所得到的结果更为可靠（标准误差相对较小）(Nei et al, 1974)。然而许多研究者却更趋向于选用较大的样本容量，相对少的位点数进行群体遗传多样性分析（Zhou et al, 2001; Liao et al, 2005）。Nei et al (1978)认为，样本容量的选择主要依赖于研究目的，对于哈代温格平衡、期望杂合度的计算推荐使用较大的样本容量。而对于群体间遗传距离的计算则需要根据两群体的差异确定样本容量的大小。一般情况下，30 通常作为大小样本界定的标准（Gu et al, 2000）。在本研究中，期望杂合度、观测杂合度并没有随着样本容量的变化表现出明显的趋势，当样本量达到 40 个时趋于稳定。因此，在进行遗传多样性分析时，要充分考虑样本量对不同遗传多样性度量指标的影响，避免由样本量的差别所引起的不能通过对遗传参数测度正确的反映种群间的客观差别。

3.2　标记量对遗传多样性测度指标的影响

样本量的确定还与所选用的标记量有关。Nei (1987)在应用单一位点等位基因频率进行固定指数

的估计时认为，只有当样本容量达到 30 以上才能得到准确结果。在利用多个位点进行遗传多样性分析，样本容量则需达到 50 以上。本研究利用 45 个微卫星分子标记分析样本量为 60 的草鱼自然群体的遗传变异，结果发现，微卫星分子标记数与遗传参数之间存在着明显的关系。随着标记数的增加，等位基因数、有效等位基因数、期望杂合度、观测杂合度明显可以划分为两个变化阶段，当标记数量在 5—15 时，变化相当剧烈，说明标记数低于 15 时，所得的研究结果很不可靠，只有当标记数超过 25 时，以上参数值均趋于稳定。该结论与 Zhou et al（2005）和 Liu et al（2005）研究观察到的结果相似。即样本容量保持不变，各遗传参数随着分子标记数量的增加表现出先升高后降低的变化趋势。

此外，研究对象的遗传多样性水平还与所选用的微卫星标记的多态性高低有很大联系。*PIC* 是衡量位点多态性的较好指标，通过利用不同 *PIC* 的微卫星标记对该草鱼群体的遗传多样性进行比较发现，选用不同多态信息含量的分子标记对群体遗传多样性的评估结果存在差异极显著。因此标记的选择也会影响到评估的准确性。联合国粮农组织（FAO）推荐用于评价家畜种质资源评估的微卫星 DNA 位点的等位基因数应为 4—10。本研究所选用的微卫星标记的等位基因数量范围为 2—14(Barker, 1994)。Lewontin & Hubby（1966）认为评价群体的遗传多样性必须研究多个位点，对微卫标记的选用尽量采用随机原则，不能进行过多的人为的干预。

3.3 标记量和样本量的最适组合

联合国粮农组织在关于保护家畜遗传多样性草案报告中提出，以微卫星分子标记技术作为 14 种家畜遗传多样性分析的首选标记，以有效标记量为 30，样本容量为 50 作为种质资源评估的标准(Barker et al, 1993)。Nei (1978)的研究认为，在进行群体内遗传距离、平均期望杂合度的评价时，样本量固定的情况下，位点数的增加比样本数量的增加更能够得到可靠的结果，在位点数量足够大，多于 50 个位点时，即使用小的样本量也可以得到较可靠的结果。Nei 的结论在我们的研究结果中得到了证明(图 8)：当样本量为 60 个时，位点数达到 15，与当标记量为 45，样本量为 30 所得到的结果相同，期望杂合度均趋于稳定。此外，通过对等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度等遗传学参数的分析发现，在样本量固定的情况下，位点数的增加可以对有限的样本量进行补充。同时，当样本量足够大，选择适量标记也可得到同样可靠的结果。但样本量以及标记量的选用均有其最低值，即研究下限：对于样本量为 60 的草鱼群体，最低标记量为 25；当标记量为 45 时，最小样本量应达到 40。这与 Lu et al（2008）在关于样本量对镜鲤养殖群体的遗传参数的影响中得到的结论相似，即样本容量 30—50，标记数 20 以上，是对群体遗传多样性进行客观评价的必要条件。

3.4 草鱼群体遗传多样性的评价及遗传多样性指标的选择

本研究利用 45 个多态性标记对样本容量为 60 的草鱼自然群体进行遗传多样性评估，其平均等位基因数（*MNA*）、平均有效等位基因数分别为 7.26、4.21，平均观测杂合度、平均期望杂合度分别为 0.73、0.68。与 DeWoody& Avise（2000)基于 13 种淡水鱼类统计而得出的平均杂合度为 0.46，平均等位基因数为 7.5 相比，具有较高的遗传多样性。

然而，Zhao et al（1996）采用同工酶技术对长江中下游四个江段的草鱼群体进行研究，在所检测的 15 个位点中只有一个位点表现出多态性，多态位点比例和平均杂合度分别为 0.0666、0.0237。Liao et al（2005)采用 6 个多态微卫星标记研究来自长江水系样本量 18—34 尾的四个草鱼群体的遗传结构，平均观测杂合度 0.47—0.64，平均期望杂合度 0.4—0.57，由此认为其遗传多样性偏低。并推测草鱼有可能在历史上经历了瓶颈效应，由一个相对较小的群体演化而来。此外，Zhang et al（2001)、Li et al（1998b)、Wu et al 2006)等分别采用 RAPD、mtDNA、PCR-RFLP 等技术对草鱼的遗传多样性进行检测均得到遗传多样性较低这一结论。

通过对以上研究结果进行比较发现，研究所获得的差异性结论可能由于所研究的水系不同，或是标记的选择、样本量的采集以及参数的选用等差异，对群体的遗传多样性的评估结果造成影响。因此，关于我国各大水系野生草鱼群体的遗传多样性水平仍需要进一步研究探讨。

4 小 结

本文通过探讨样本量、标记量的选用对野生草鱼遗传多样性检测的影响，结合前人的研究成果，为今后的草鱼种群遗传多样性评价工作提出以下建议：1）选用具有较高多态性的遗传标记。有研

究表明：能用于解决种群问题的同功酶的数量非常有限(Richards et al, 1996)，大多数研究使用同功酶的多态位点不超过 11 个，平均每研究使用 6 个(Nevo et al, 1984)。因此，在同等样本量的情况下采用多态性高的标记，能增加检出多态位点及不同等位基因的能力，得到更为准确的结果。2）在研究瓶颈效应对种群的影响时，使用每个位点上的等位基因数目这一指标与杂合度相比更为合适。若仅从杂合度这一指标推断某一群体经历瓶颈期这一结论是不够准确的。Nei 等认为，等位基因数对群体大小的波动更为敏感(Nei et al, 1975; Maruyama et al, 1985)，其受瓶颈效应的影响也远远大于杂合度。因为稀有等位基因的丢失会引起等位基因数量的降低，对杂合度却极少造成影响(Mousadik et al, 1996)。3）根据本研究结果，建议在进行遗传学实验设计中要更多地考虑到样本量以及标记量对群体分析的重要影响。尽可能以 40 以上的样本容量，25 以上的微卫星标记对自然群体的遗传多样性水平进行较为客观的评价。

参考文献：

Barker JSF, Bradley DG, Fries R, Hill WG, Nei M, Wayne RK. 1993. An Integrated Global Programme to Establish the Genetic Relationships among the Breeds of Each Domestic Animal Species [M]. Rome: Animal Health and Production Division, FAO.

Barker JSF. 1994. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds [C] Proceedings of the 5 th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production,Guelph and Ontario, Canada. Livestock: University of Guelph, **21**: 501-508.

DeWoody JA, Avise JC. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. *J Fish Biof*, **56**: 461-473.

Dong B, Xi DQ, Meng H, Yu JF, Zhao XT, Duan XJ, Gu ZL. 2007. Identification and genetic analysis of SNPs in duck adiponectin gene [J]. *Hereditas,* **29**(8): 995-1000. [董　飚, 龚道清, 孟　和, 郁建锋, 赵旭庭, 段修军, 顾志良. 2007. 鸭脂联素基因单核苷酸多态性检测及群体遗传分析. 遗传, **29**(8): 995-1000.]

Dreisigackera S, Zhangb P, Warburtonb ML, Skovmandc B, Hoisingtonb D, Melchingera AE. 2005. Genetic diversity among and within CIMMYT wheat landrace accessions investigated with SSRs and implications for plant genetic resources management [J]. *Crop Sci*, **45**: 653-661.

Gu WC. 2000. Statistical Genetics [M]. Beijing: Scientific Publishers. [顾万春. 2000. 统计遗传学. 北京: 科学出版社]

Huang L, Wang YQ. 2004. SSR Polymorphism of alligator sinesis and conservation strategy of genetic diversity [J]. *Acta Genet Sin*, **31**(2): 143-150. [黄　磊, 王义权. 2004. 扬子鳄种群的微卫星多态及其遗传多样性保护对策分析. 遗传学报, **31**(2): 143-150.]

Leberg PL. 2002. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks [J]. *Mol Ecol*, **11**: 2445-2449.

Lewontin RC, Hubby JL. 1996. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations.Ⅱ. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* [J]. *Genetics*, **54**: 595-609.

Li SF. 1998a. Genetical Characterization of Major Freshwater Culture Fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers. [李思发. 1998a. 中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究. 上海: 上海科学技术出版社].

Li SF, Lv GQ, Louis Bem atchez. 1998b. Diversity of mitochondrial DNA in the populations of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Zool Sin,* **4**(1): 82-93. [李思发, 吕国庆, 贝纳切兹. 1998b. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析. 动物学报, **4**(1): 82-93.]

Liao XL, Yu XM, Tan DQ, Tong JG. 2005. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **29**(2): 113-119. [廖小林, 俞小牧, 谭德清, 童金苟. 2005. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星DNA分析. 水生生物学报, **29**(2): 113-119.]

Liu QS, Feng DY, Zhang HM, Liu SF. 2008. Genetic diversity of Chinese Shar-pei Dog using microsatellite DNA markers [J]. *Zool Res,* **29**(1): 31-36. [刘清神, 冯定远, 张慧明, 刘胜福. 2008. 中国沙皮犬微卫星DNA分析的遗传多样性. 动物学研究, **29**(1): 31-36.]

Liu L, Liu CW, Zeng JM. 2005. Study on the Optimal Sample and Loci Quantity for RAPD Analysis [J]. *J Zhanjiang Ocean Univ,* **25**(4): 1-4. [刘丽, 刘楚吾, 曾健民. 2005. RAPD分析中最适样本量和位点数的研究. 湛江海洋大学学报, **25**(4): 1-4.]

Lu CY, Jin WK, Sun XW, Li DY, Zhu XD, Ma HT, Yu DM, Yang JX. 2008. Effects of sample size on various genetic structure parameter in cultured population genetic study [J]. *J Fish Chn,* **32**(5): 674-683. [鲁翠云, 金万昆, 孙效文, 李大宇, 朱晓东, 马海涛, 于东梅, 杨建新. 2008. 样本容量对养殖群体内主要遗传结构分析参数的影响. 水产学报, **32**(5): 674-683.]

Maruyama T, Fuerst PA. 1985. Population bottleneck and non-equilibrium models in population geneticsⅡ. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck [J]. *Genetics*, **111**(3): 675-689.

Mousadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree *Argania spinosa* (L.) Skeels endemic to Morocco [J]. *Theor Appl Genet*, **92**: 832-839.

Nei M., Roychoudhury AK. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. *Genetics*, **76**: 379-390.

Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations [J]. *Evolution*, **29**: 1-10.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics,* **89**: 583-590.

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press.

Nevo E, Beiles A, Ben-Shlomo R. 1984. The Evolutionary Significance of Genetic Diversity: Ecological, Demographic and Life-History Correlates[M]// G. S. Mani ed. Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity (Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 53). Berlin:Springer-Verlag, 13–213

Richards C, Leberg PL. 1996. Temporal changes in allele frequencies and a population's history of severe bottlenecks [J]. *Conserv Biol*, **10**: 832-839.

Sjögren P, Wyöni PI. 1994. Conservation genetics and detection of rare alleles in finite populations [J]. *Conserv Biol*, **8**: 267-270.

Tang SQ, Dai WJ, Li MS, Zhang Y, Geng YP, Wang L, Zhong Y. 2008. Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis* (Pinaceae) revealed by AFLP and SSR markers [J]. *Genetica*, **133**(1): 21-30.

Wei DW, Lou YD, Xun XW, Shen JB. 2001. Isolation of microsatellite markers in the common carp (Cyprinuscarpio) [J]. *Zool Res,* **22**(3): 238-241.[魏东旺, 楼允东, 孙效文, 沈俊宝. 2001. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选. 动物学研究, **22**(3): 238-241.]

Wu LZ, Xiong QM. 1992. Biochemical genetic structure and variation in a natural population of grass carp from the middle reaches of the Yangtze River [J]. *Acta Genet Sin,* **19**(3): 221-227. [吴力钊, 熊全沫. 1992. 长江中游草鱼天然种群的生化遗传结构及变异. 遗传学报, **19**(3): 221-227.]

Wu HF, Dong S, Shan Q, Taniguchi Nobuhiko. 2006. PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop region of three populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Fish Sci,* **25**(4): 185-188. [吴海防, 董仕, 单 淇, 谷口顺彦. 2006. 3个群体草鱼mtDNA D-Loop的PCR-RFLP分析. 水产科学, **25**(4): 185-188.]

Zhang SM, Wang DQ, Deng H, Yu LN. 2002. Mitochondrial DNA variations of silver carp and grass carp in populations of the middle rearches of the Yangtze River revealed by using RFLP-PCR [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **26**(2): 142-147. [张四明, 汪登强, 邓 怀, 余来宁. 2002. 长江中游水系鲢和草鱼群体mtDNA遗传变异的研究. 水生生物学报, **26**(2): 142-147.]

Yan LN, Zhang XD. 2004. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsateilite DNA markers [J]. *Acta Zool Sin,* **50**(2): 279-290. [闫路娜, 张德兴. 2004. 种群微卫星DNA分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响. 动物学报, **50**(2): 279-290.]

Zhang YW, Zhang YP, Oliver AR. 2001. Microsatellites and its application [J]. *Zool Res*, **22**(4): 315-320.[张云武, 张亚平, Oliver A Ryder. 2001. 微卫星及其应用. 动物学研究, **22**(4): 315-320.]

Zhang XY, Zhang DC, Yang DS, Deng FJ, Yu LN, Fang YL. 1999. Analysis on genetic diversity of *hypophthalmichys molitrix* in Changjiang River [J]. *J fishChn,* **23**: 7-14. [张锡元, 张德春, 杨代淑, 邓凤姣, 余来宁, 方耀林. 1999. 长江鲢遗传多样性的随机扩增多态DNA分析. 水产学报, **23**(增刊): 7-14.]

Zhang SM, Deng H, Wang DQ, Xu LN. 2001. Population structure and genetic diversity of silver carp and grass carp from populations of Yangtze river system revealed by RAPD [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **25**(4): 324-330. [张四明, 邓 怀, 汪登强, 余来宁. 2001. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的RAPD研究. 水生生物学报, **25**(4): 324-330.]

Zhao JL, Li SF. 1996. Isoenzyme analysis of population divergence of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang river [J]. *J fish Chn,* **20**(2): 104-110. [赵金良, 李思发. 1996. 长江下流中下游鲢、鳙、草鱼、青鱼原种种群分化的同工酶分析. 水产学报, **20**(2): 104-110.]

Zhou YH, Jiang QW, Zhao GM, Wei JG. 2005. Appropriate sample size and molecular marker loci in the study of genetic diversity of *Ocomelania Hupensis* [J]. *Chn J Epidemiol,* **26**(12): 951-954. [周艺彪, 姜庆五, 赵根明, 韦建国. 2005. 湖北钉螺扩增片段长度多态性分子标记遗传多样性研究的合理样本量与分子位点数. 中华流行病学杂志, **26**(12): 951-954.]

Zhou L, Liu JX. 2001. Preliminary investigation on genetic diversity of gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio Bioch*) detected by microsateilite DNA [J]. *Zool Res*, **22**(4):257-264. [周 莉, 刘静霞, 桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, **22**(4): 257-264.]

Zhu WY，Zhou TY，Zhong M，Lu BR. 2006. Sampling strategy for wild soybean (*Glycine soja*) populations based on their genetic diversity and fine-scale spatialgenetic structure [J]. *J Fudan Univ (Nat Sci)*, **45**(3): 321-326.[朱维岳, 周桃英, 钟 明. 2006. 卢宝荣基于遗传多样性和空间遗传结构的野生大豆居群采样策略. 复旦学报(自然科学版), **45**(3): 321-326.]